

WO0141803

Publication Title:

COMBINATION OF COMPOUNDS THAT INHIBIT THE BIOLOGICAL EFFECTS OF TNF- alpha AND CD95L IN A MEDICAMENT

Abstract:

1478 Abstract of WO0141803

The invention relates to medicaments that contain one or more compounds that inhibit the biological effects of TNF- alpha and CD95L, for example by blocking the binding of said ligands to their natural receptors, thereby blocking signal transduction. The preferred compounds are neutralizing anti-TNF alpha antibodies and neutralizing anti-CD95L antibodies. The invention further relates to the use of the inventive compounds for preventing or treating strokes or heart attacks. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Juni 2001 (14.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/41803 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 39/395, A61P 9/10, 25/28

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/04371

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. Dezember 2000 (06.12.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 59 049.4 7. Dezember 1999 (07.12.1999) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg (DE).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): KRAMMER, Peter [DE/DE]; Werderstrasse 2, 69120 Heidelberg (DE). MARTIN-VILLALBA, Ana [ES/DE]; Kastellweg 3, 69120 Heidelberg (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schlüssler, Truderinger Strasse 246, 81825 München (DE).

(54) Title: COMBINATION OF COMPOUNDS THAT INHIBIT THE BIOLOGICAL EFFECTS OF TNF- α AND CD95L IN A MEDICAMENT

(54) Bezeichnung: KOMBINATION VON VERBINDUNGEN, WELCHE DIE BIOLOGISCHEN WIRKUNGEN VON TNF- α UND CD95L HEMMEN, IN EINEM ARZNEIMITTEL

(57) Abstract: The invention relates to medicaments that contain one or more compounds that inhibit the biological effects of TNF- α and CD95L, for example by blocking the binding of said ligands to their natural receptors, thereby blocking signal transduction. The preferred compounds are neutralizing anti-TNF α antibodies and neutralizing anti-CD95L antibodies. The invention further relates to the use of the inventive compounds for preventing or treating strokes or heart attacks.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden Arzneimittel, die eine oder mehrere Verbindungen enthalten, welche die biologischen Wirkungen von TNF- α und CD95L hemmen, beispielsweise dadurch, daß die Bindung dieser Liganden an ihre natürlichen Rezeptoren blockiert wird, und damit eine Signaltransduktion unterbleibt. Vorzugsweise handelt es sich bei diesen Verbindungen um einen neutralisierenden anti-TNF- α -Antikörper und einen neutralisierenden anti-CD95L-Antikörper. Beschrieben wird ferner die Verwendung der vorstehenden Verbindungen zur Prävention oder Behandlung eines Schlaganfalls oder Herzinfarkts.



WO 01/41803 A1

KOMBINATION VON VERBINDUNGEN, WELCHE DIE BIOLOGISCHEN WIRKUNGEN VON TNF-ALPHA
UND CD95L HEMMEN, IN EINEM ARZNEIMITTEL

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Arzneimittel, das eine
oder mehrere Verbindungen enthält, welche die biologischen
Wirkungen von TNF- α und CD95L hemmen, beispielsweise dadurch,
daß die Bindung dieser Liganden an ihre Rezeptoren blockiert
10 wird und damit eine Signaltransduktion unterbleibt. Vorzugs-
weise handelt es sich bei diesen Verbindungen um einen neutra-
lisierenden anti-TNF- α -Antikörper und einen neutralisierenden
anti-CD95L-Antikörper. Die vorliegende Erfindung betrifft auch
die Verwendung der vorstehenden Verbindungen zur Prävention
oder Behandlung eines Schlaganfalls oder Herzinfarkts.

15 Der Tod durch Schlaganfall stellt die dritthäufigste Todes-
ursache in den meisten westlichen Staaten dar. Darüber hinaus
stehen die durch Schlaganfälle hervorgerufenen Behinderungen,
beispielsweise Lähmungen, praktisch an erster Stelle unter den
20 monokausalen Behinderungen. Die Behandlung des Schlaganfalls
bestand bisher hauptsächlich in der unterstützenden Pflege und
der Verhinderung von weiteren, dadurch bedingten Komplikatio-
nen. Die gegenwärtigen experimentellen und klinischen Daten
deuten darauf hin, daß das therapeutische Fenster variabel ist
25 und auch 6 bis 8 Stunden übersteigen kann. Dieses variable
Intervall wird durch die ischämische Penumbra bestimmt. Dabei
handelt es sich um einen Bereich, der das Zentrum der ischä-
mischen Läsion umgibt und bis zu dessen Absterben Stunden
vergehen können. Inzwischen häufen sich die Anzeichen dafür,
30 daß die Neuronen in der ischämischen Penumbra einer Apoptose
unterliegen. Somit sind die Therapien am meisten erfolgsver-
sprechend, die auf einer neuroprotektiven Strategie basieren,

d.h. auf eine Unterdrückung der Apoptose hinzielen.

5 Zwei Mitglieder der Tumornekrosefaktor(TNF)-Familie, CD95 (auch Fas oder ApoI genannt) und der TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1, auch p55 oder CD120a genannt), sind häufig an der Auslösung von Apoptose beteiligt. Diese Rezeptoren zeichnen sich durch eine homologe zytoplasmatische Aminosäuresequenz aus (die "Todes-Domäne"), die für die Transduktion des apoptotischen Signals von ausschlaggebender Bedeutung ist. Bei den natürlichen Liganden CD95L bzw. TNF handelt es sich um strukturell verwandte Transmembranproteine vom Typ II. Die Bindung des trimerisierten Liganden an den Rezeptor führt zur Rekrutierung des Proteins FADD ("Fas-associated death domain", auch MORT1 genannt). Nach Rekrutierung von FADD wird Caspase-8 durch 10 Selbstspaltung aktiviert und schließlich durchlaufen die Zellen durch Aktivierung weiter abwärts liegender Effektor-Caspasen eine Apoptose.

20 Im Anschluß an eine Ischämie im Gehirn wird in der ischämischen Penumbra die Expression von TNF, CD95L und CD95 gesteigert. Die Rolle von TNF bei mit Gehirn-Ischämie in Zusammenhang stehenden Schädigungen ist dabei aber umstritten, jedenfalls resultierte die Verabreichung von TNF vor dem ischämischen Infarkt in einer signifikant verringerten Infarktgröße. Die Rolle von CD95/CD95L scheint eher eindeutig schädlich zu sein. Allerdings war bisher vollkommen unklar, ob diese beiden Liganden/Rezeptor-Systeme bei der Induktion der Ischämie kooperieren oder gegeneinander arbeiten. Jedenfalls gibt es bisher keine zufriedenstellende Therapie, um bei gefährdeten Personen einer Ischämie im Gehirn bzw. einem Schlaganfall vorbeugen zu können oder zumindest die dabei auftretenden Schädigungen verhindern oder wenigstens reduzieren zu können.

35 Somit liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, Mittel bereitzustellen, mit denen - beispielsweise bei gefährdeten Personen - einer Ischämie im Gehirn bzw. einem Schlaganfall vorgebeugt werden kann und/oder die dabei auf-

tretenden Schädigungen verhindert oder reduziert werden können.

5 Die Lösung dieses technischen Problems erfolgt durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen.

10 Es konnte in der vorliegenden Erfindung gezeigt werden, daß die beiden Liganden CD95L und TNF in synergistischer Weise den Zelltod im Anschluß an Ischämie auslösen. Diese den Zelltod fördernde Rolle von CD95L und TNF beruht nicht auf Veränderungen im Blutglucosegehalt oder hämodynamischen Parametern, die einen unspezifischen neuronalen Schutz zur Verfügung stellen könnten. Aus den Experimenten ergibt sich, daß CD95L und TNF
15 sowohl bei der ischämischen als auch der entzündlichen Schädigung des Gehirns eine Rolle spielen. Bezüglich TNF oder einem funktionellen CD95L defiziente Neuronen (tnf^{-/-}-Neurone bzw. gld-Neurone) zeigten einen partiellen Schutz gegenüber dem Tod durch Ischämie (Fig. 3a). Dieser Schutz konnte auch in WT-Neuronen nachgewiesen werden, in denen TNF und CD95L durch als
20 "Köder" eingesetzte Rezeptorproteine dem System entzogen worden waren. Der Schutz war in vitro in tnf^{-/-}-Neuronen höher als in gld-Neuronen. In der in vivo-Situation zeigten allerdings die Infarkt volumina in tnf^{-/-}- und gld-Mäusen keinen signifikanten Unterschied. Allerdings wurden Granulozyten zu dem ischämischen Bereich in tnf^{-/-}-Mäusen zu einem geringeren Ausmaß im Vergleich zu den gld-Mäusen rekrutiert. Die ähnliche
25 Potenz von CD95L hinsichtlich der Förderung der ischämischen Schädigung kann durch dessen zusätzliche Fähigkeit zur Aktivierung der Maschinerie der zytotoxischen Granulozyten erklärt werden - Granulozyten vermitteln die direkte Zytolyse von CD95L+-Zellen. Jedenfalls zeigten CD95L und TNF eine synergistische Wirkung bei der Schädigung des Hirns nach einem Schlaganfall. Schließlich zeigte sich, daß der durch gld-, tnf^{-/-}- und gld/tnf^{-/-} gezeigte neuronale Schutz (anhand des Infarkt volumens sichtbar gemacht; Fig. 1b) zu der Sterblichkeitsrate dieser Mäuse innerhalb des Beobachtungszeitraums parallel verlief (Fig. 1a). Somit führte die Verringerung der
30
35

Hirnschädigung zu einer erhöhten Überlebensrate der Tiere. Der auffallende bei $gld/tnf^{-/-}$ -Mäusen beobachtete neuronale Schutz zeigt, daß $TNF-\alpha$ /TNF-Rezeptor und CD95L/CD95 pharmakologische Ziele bei der Prävention/Behandlung des Schlaganfalls darstellen. Heutzutage zielen Strategien hinsichtlich eines neuronalen Schutzes auf die Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit der ischämischen Neuronen solange bis eine Reperfusion normalerweise wieder etabliert werden kann. Auf eine zerebrale Reperfusion folgt jedoch eine Zerstörung und eine weitere Ausdehnung der Infarktzone. Somit kann davon ausgegangen werden, daß ein Schutz sowohl gegenüber Schäden durch Reperfusion als auch ischämischen Zelltod als eine ideale Therapie des Schlaganfalls angesehen werden kann. Aufgrund der in der vorliegenden Erfindung erhaltenen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, daß dies dadurch erreicht werden kann, daß die biologische Wirkung von $TNF-\alpha$ und CD95L gehemmt bzw. neutralisiert wird.

Somit betrifft eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein Arzneimittel, das eine oder mehrere Verbindungen enthält, welche die biologischen Wirkungen von $TNF-\alpha$ und CD95L hemmen.

Der hier verwendete Ausdruck "Verbindungen, welche die biologischen Wirkungen von $TNF-\alpha$ und CD95L hemmen" betrifft alle Verbindungen, welche die biologischen Wirkungen von $TNF-\alpha$ und CD95L vollständig oder zumindest wesentlich hemmen bzw. neutralisieren können. Die Wirkung kann beispielsweise darauf beruhen, daß die Bindung von $TNF-\alpha$ und CD95L an ihre natürlichen Rezeptoren und somit die dadurch bewirkten Signalübertragungen unterdrückt werden. Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, daß Antikörper verwendet werden, die derart entweder an $TNF-\alpha$ selbst oder den $TNF-\alpha$ -Rezeptor binden bzw. an CD95L selbst oder CD95, daß die Bindung von $TNF-\alpha$ und CD95L an die Rezeptoren blockiert wird. Auch können kleinmolekulare Substanzen verwendet werden, die mit der Bindung von $TNF-\alpha$ an den $TNA-\alpha$ -Rezeptor bzw. mit der Bindung von CD95L an den CD95L-Rezeptor interferieren. Des weiteren können auch Analog-

stoffe, beispielsweise des extrazellulären, löslichen Teils des Rezeptors oder ein verändertes TNF- α bzw. CD95L, beispielsweise ein kompetitiver oder nichtkompetitiver Antagonist, verwendet werden, wobei durch die (bevorzugte) Bindung von TNF- α bzw. CD95L an das Rezeptoranalogen bzw. die (bevorzugte) Bindung des Antagonisten an den natürlichen Rezeptor die Bindung des biologisch aktiven TNF- α bzw. CD95L an den natürlichen Rezeptor verringert oder ganz aufgehoben wird.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Arzneimittels sind die Verbindungen, welche die Bindung von TNF- α und CD95L an ihre natürlichen Rezeptoren verhindern, ein neutralisierender anti-TNF- α -Antikörper und ein neutralisierender anti-CD95L-Antikörper oder Fragmente davon, vorzugsweise monoclonale Antikörper oder Fragmente davon.

Verfahren zur Gewinnung solcher Antikörper sind dem Fachmann bekannt und umfassen beispielsweise bezüglich polyclonaler Antikörper die Verwendung von TNF- α bzw. CD95L oder eines
20 Fragments davon oder eines von der Aminosäuresequenz abgeleiteten synthetischen Peptids als Immunogen zur Immunisierung geeigneter Tiere und die Gewinnung von Serum. Verfahren zur Herstellung monoclonaler Antikörper sind dem Fachmann ebenfalls bekannt. Dazu werden beispielsweise Zell-Hybride aus
25 Antikörper produzierenden Zellen und Knochenmark-Tumorzellen hergestellt und cloniert. Anschließend wird ein Clon selektiert, der einen Antikörper produziert, der für TNF- α bzw. CD95L spezifisch ist. Dieser Antikörper wird dann hergestellt. Beispiele von Zellen, die Antikörper produzieren, sind Milzzellen, Lymphknotenzellen, B-Lymphozyten etc.. Beispiele von
30 Tieren, die zu diesem Zweck immunisiert werden können, sind Mäuse, Ratten, Pferde, Ziegen und Kaninchen. Die Myelomzellen lassen sich aus Mäusen, Ratten, Menschen oder anderen Quellen erhalten. Die Zellfusion kann man beispielsweise durch das
35 allgemein bekannte Verfahren von Köhler und Milstein durchführen. Die durch Zellfusion erhaltenen Hybridome werden mittels TNF- α bzw. CD95L nach dem Enzym-Antikörper-Verfahren oder nach einem ähnlichen Verfahren abgesucht. Clone werden bei-

- spielsweise mit dem Grenz-Verdünnungsverfahren erhalten. Die erhaltenen Clone werden BALB/c-Mäusen intraperitoneal implantiert, nach 10 bis 14 Tagen wird der Ascites der Maus entnommen, und der monoclonale Antikörper durch bekannte Verfahren (beispielsweise Ammoniumsulfatfraktionierung, PEG-Fraktionierung, Ionenaustauschchromatographie, Gelchromatographie oder Affinitätschromatographie) gereinigt. In dem erfindungsgemäßen Arzneimittel kann der gewonnene Antikörper direkt verwendet werden oder es kann ein Fragment davon verwendet werden. In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff "Fragment" alle Teile des monoclonalen Antikörpers (z.B. Fab-, Fv- oder "single chain Fv"-Fragmente), welche die gleiche Epitopspezifität wie der vollständige Antikörper aufweisen.
- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die in dem erfindungsgemäßen Arzneimittel enthaltene monoclonale Antikörper aus einem Tier (z.B. Maus) stammende Antikörper, humanisierte Antikörper oder chimäre Antikörper oder Fragmente davon. Chimäre, menschlichen Antikörper ähnelnde oder humanisierte Antikörper besitzen eine herabgesetzte potentielle Antigenität, jedoch ist ihre Affinität gegenüber dem Ziel nicht herabgesetzt. Die Herstellung von chimären und humanisierten Antikörpern bzw. von den menschlichen Antikörpern ähnelnden Antikörpern wurde ausführlich beschrieben (siehe beispielsweise Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 10029; und Verhoeyan et al., Science 239 (1988), 1534). Humanisierte Immunglobuline weisen variable Grundgerüstbereiche auf, die im wesentlichen von einem humanen Immunglobulin stammen (mit der Bezeichnung Akzeptor-Immunglobulin) und die Komplementarität der determinierenden Bereiche, die im wesentlichen von einem nicht-menschlichen Immunglobulin (z.B. von der Maus) stammen (mit der Bezeichnung Donor-Immunglobulin). Die (der) konstante(n) Bereich(e) stammt/stammen, falls vorhanden, auch im wesentlichen von einem menschlichen Immunglobulin. Bei der Verabreichung an menschliche Patienten bieten die erfindungsgemäßen humanisierten (sowie die menschlichen) anti-TNF- α -Antikörper bzw anti-CD95L-Antikörper eine Reihe von Vorteilen gegenüber Antikörpern von Mäusen oder

anderen Spezies: (a) das menschliche Immunsystem sollte das Grundgerüst oder den konstanten Bereich des humanisierten Antikörpers nicht als fremd erkennen und daher sollte die Antikörper-Antwort gegen einen solchen injizierten Antikörper geringer ausfallen als gegen einen vollständig fremden Maus-Antikörper oder einen partiell fremden chimären Antikörper; (b) da der Effektorbereich des humanisierten Antikörpers menschlich ist, dürfte er mit anderen Teilen des menschlichen Immunsystems besser interagieren, und (c) injizierte humanisierte Antikörper weisen eine Halbwertszeit auf, die im wesentlichen zu der von natürlich vorkommenden menschlichen Antikörpern äquivalent ist, was es erlaubt, kleinere und weniger häufige Dosen im Vergleich zu Antikörpern anderer Spezies zu verabreichen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße Arzneimittel Verbindungen, die (a) ein TNF- α -Antagonist und ein CD95L-Antagonist, (b) ein löslicher TNF- α -Rezeptor und ein löslicher CD95-Rezeptor oder Teile davon oder (c) Gemische aus einer oder beiden Verbindungen aus (a) und (b) sind. Der Fachmann weiß, wie er solche Verbindungen bereitstellen kann. Insbesondere wird auf das deutsche Patent P 44 12 177 des Anmelders und die Arbeit von Dhein et al., Nature 373 (1995), 438-441 verwiesen.

Die Verbindungen, welche die biologische Wirkung von TNF- α und CD95L neutralisieren, werden gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger verabreicht. Beispiele für geeignete Träger sind dem Fachmann bekannt und dazu gehören beispielsweise Phosphat-gepufferte Salzlösungen, Wasser, Emulsionen, Netzmittel etc.. Die Verabreichung der diese Verbindungen enthaltenden Arzneimittel kann oral oder, vorzugsweise, parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle, intramuskuläre, subkutane, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale oder intranasale Verabreichung. Die geeignete Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt von verschiedenen Faktoren

ab, beispielsweise von dem Alter, dem Geschlecht, dem Gewicht des Patienten, dem Stadium und Ausmaß des Schlaganfalles oder Herzinfarkts, der Art der Verabreichung etc..

- 5 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung be-
trifft die Verwendung der vorstehenden Verbindung(en), die
biologische Wirkung von TNF- α und die biologische Wirkung von
CD95L zu hemmen bzw. zu neutralisieren zur Prävention oder
Behandlung eines Schlaganfalls oder Herzinfarkts. Bezüglich
10 der für diese Verwendung geeigneten Verbindungen sind alle
vorstehend beschriebenen Verbindungen geeignet, vorzugsweise
ein neutralisierender anti-TNF- α -Antikörper und ein neutrali-
sierender anti-CD95L-Antikörper oder Fragmente davon. Beson-
ders bevorzugt sind monoclonale Antikörper oder Fragmente
15 davon, und am meisten bevorzugt sind aus einem Tier stammende
Antikörper, humanisierte Antikörper oder chimäre Antikörper
oder Fragmente davon. In einer alternativen Ausführungsform
sind die Verbindungen (a) ein TNF- α -Antagonist und ein CD95L-
Antagonist, (b) ein löslicher TNF- α -Rezeptor und ein löslicher
20 CD95-Rezeptor oder Teile davon oder (c) Gemische aus einer
oder beiden Verbindungen aus (a) und (b). Für die Verwendung
bei der Prävention oder Behandlung eines Herzinfarkts kann es
- vor allem in Abhängigkeit von der Schwere des Krankheits-
bilds - sinnvoll sein, die erfindungsgemäßen Verbindungen noch
25 mit thrombolytischen Mitteln zu kombinieren. Geeignete throm-
bolytische Mittel sind auf dem Fachgebiet bekannt und umfassen
beispielsweise Acetylsalicylsäure, Nitroglycerin, Cumarin,
Heparin, Heparinoide, Fibrinolytika etc.
- 30 Ergänzend wird betont, daß sich ein erfindungsgemäßes Arznei-
mittel nicht nur dazu eignet, einer Ischämie im Gehirn bzw.
einem Schlaganfall oder Herzinfarkt vorzubeugen, und / oder
die dabei entstehenden Schädigungen zu verhindern oder zu
reduzieren, sondern auch generell bei neurodegenerativen Er-
35 krankungen, wie Alzheimer, Parkinson und Rückenmark-Trauma,
verwendet zu werden.

Die Figuren zeigen:

Figur 1: Ischaemische Hirnschädigungen sind in gld-, tnf^{-/-} und gld/tnf^{-/-}-Mäusen verringert

(A) Sterblichkeit (in %) innerhalb von 24 Stunden nach Verschluß der mittleren zerebralen Arterie (MCA) in Wildtyp- (n=14), gld- (n=17), tnf^{-/-} (n=13) und gld/tnf^{-/-} (n=15) Mäusen.

(B) Infarktvolumen nach transientser fokaler Ischaemie in Wildtyp- (n=9), gld- (n=8), tnf^{-/-} (n=7) und gld/tnf^{-/-} (n=8) Mäusen. Die Tiere wurden 90 min einem MCA-Verschluß unterworfen und wie beschrieben 24 Stunden reperfundierte. 20 µm dicke, jeweils 400 µm voneinander entfernte koronale Kryostat-Schnitte wurden Silber-gefärbt. Das Infarktvolumen wurde durch die numerische Integration von Bereichen mit deutlicher Blässe gegenüber der Dicke der Schnitte bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte ± S.E.M dargestellt. Die Signifikanz wurde durch Vergleich von gld-, tnf^{-/-} und gld/tnf^{-/-}-Mäusen mit Wildtypmäusen unter Verwendung des "Mann Whitney's"-Tests bestimmt (P<0,01, P<001 bzw. P<0,001).

(C) Die Bildanalyse der regionalen Infarkthäufigkeiten des kranzförmigen Bereichs bei Bregma -2,3 mm von Wildtyp-, gld-, tnf^{-/-} und gld/tnf^{-/-}-Mäusen verdeutlicht eine relative Aussparung des motorischen und somatosensorischen Cortex und des Striatums in gld-Mäusen und des gesamten angrenzenden Neocortex, Striatums und Thalamus in tnf^{-/-}-Mäusen. In gld/tnf^{-/-}-Mäusen war der Hippocampus praktisch der einzige betroffene Bereich. MCx: motorischer Cortex; SSCx: somatosensorischer Cortex; Hc: Hippocampus; Th: Thalamus; St: Striatum.

Figur 2: CD95L und TNF sind in der ischämischen Penumbra in der gleichen Zelle lokalisiert

Doppel-Immunfluoreszenzanalyse wurde an Gehirnschnitten von Wildtyp-Mäusen durchgeführt, die einem 90minütigen MCA-Verschluß und einer 24stündigen Reperfusion unterworfen worden waren. Zellen in der ischämischen Penumbra waren hinsichtlich CD95L und TNF positiv (FITC: grün; Cy3: rot; beide zusammen: gelb)

Figur 3: Schutz gegenüber Tod durch Ischämie im in vitro-Modell für einen vaskulären Schlaganfall.

(A) Rinden-Neuronen von Wildtyp-, gld-, tnf^{-/-}- und gld/tnf^{-/-}-Mäusen wurden einem sechsständigen Sauerstoff/Glucose-Entzug (OGD) und ansteigenden Reperfusions-Perioden (R) unterworfen. Der spezifische Tod wurde nach 3, 18 und 24 Stunden Reperfusion (R) bestimmt. (B) Rinden-Neuronen von Wildtyp-Tieren wurden vor der Induktion von 6 Stunden OGD und 18 Stunden Reperfusion mit CD95-Fc-Proteinen und TNF-R2-Fc-Proteinen (je 20 µg) inkubiert; der spezifische Tod wurde am Ende der Reperfusionsperiode ermittelt. Die Inkubation mit Kontroll-Immunglobulin (IgG₁) hatte keine Auswirkung hinsichtlich der Neurotoxizität der Kulturen. Der Zelltod wurde mittels des "Trypanblau-Ausschluss"-Verfahrens abgeschätzt und ist jeweils als Mittelwert ± Standardabweichung (n=3) angegeben. Der spezifische Zelltod wurde wie in den nachstehenden Beispielen beschrieben berechnet.

Figur 4: Infiltration des ischämischen Gehirns mit an Entzündungsprozessen beteiligten Zellen

Infiltration mit Granulozyten (Gr.Infiltr.; A) oder Lymphozyten (Ly.Infiltr.; B) des ischämischen Gehirns von Wildtyp-, gld-, tnf^{-/-}- und gld/tnf^{-/-}-Mäusen (n jeweils = 3) wurde mittels Autoimmunradiographie quantifiziert. Gehirnschnitte vom Gehirn, das einer herdförmigen Ischämie unterworfen worden war (90 min MCA-Verschluß und 25 Stunden Reperfusion) wurden mit primären Antisera gegen GR1 (für Granulozyten) und CD3 (für Lymphozyten) inkubiert. Die Anfärbung wurde mittels Autoradiographie bestimmt. Entzündliche Infiltrate in der ischämischen Hemisphäre wurden durch Messung des Bereichs und der optischen Dichte (OD) der Infiltrate quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± S.E.M (n=3) dargestellt.

Figur 5: Infarktausdehnung und entzündliche Infiltrate des ischämischen Gehirns werden durch anti-TNF- und anti-CD95L-Antikörper signifikant verringert

Unbehandelte (n=9; utr) oder mit Antikörpern gegen TNF und CD95L (n=8; tr) behandelte Tiere und gld/tnf^{-/-}-Tiere (n=8) wurden einem 90minütigen MCA-Verschluß und einer 24ständigen Reperfusion unterworfen. Kranzförmige Kryostat-Schnitte (Dik-

ke: 20 μm ; Abstand zueinander jeweils 400 μm) wurden Silbergefärbt. Das Infarktvolumen wurde durch numerische Integration der Bereiche mit deutlicher Blässe mit der Schnittdicke bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm S.E.M dargestellt.

5 Die Signifikanz wurde durch Vergleich der "tr"- und gld/tnf^{-/-}-Mäuse mit "utr"-Mäusen unter Verwendung des "Mann Whitney's"-Tests ($P < 0,01$ bzw. $P < 0,0001$) ermittelt. (B) Bildanalyse der regionalen Infarkthäufigkeiten des kranzförmigen Schnitts bei

10 eine relative Aussparung des motorischen und somatosensorischen Cortex und des Striatums in "tr"-Mäusen. Im gld/tnf^{-/-}-Mäusen war der Hippocampus praktisch der einzige betroffene Bereich. MCx: motorischer Cortex; SSCx, somatosensorischer Cortex; Hc: Hippocampus; Th: Thalamus; St: Striatum; C: Anzahl

15 der Granulozyten (Gr.Infiltr.) und Lymphozyten (Ly.Infiltr.) in der ischämischen Hemisphäre wurde mittels Autoimmunradio-graphie bestimmt. Gehirnschnitte von Tieren, die einer herdförmigen Ischämie unterworfen worden waren (90 min MCA-Verschluß und 24 Stunden Reperfusion) wurden mit primären Antisere-

20 ren gegen GR1 (für Granulozyten) und CD3 (für Lymphozyten) inkubiert. Die Anfärbungen wurden mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Entzündliche Infiltrate in der ischämischen Hemisphäre wurden durch Messung des Bereichs und der optischen Dichte (OD) der Infiltrate quantifiziert. Die Daten sind als

25 Mittelwerte \pm S.E.M (n=3) dargestellt.

Figur 6: Neutralisation von CD95L und TNF verringert die Sterblichkeit und verbessert die motorischen Leistungen der Tiere nach Schlaganfall

30 (A) Sterblichkeit (in %) innerhalb von drei Tagen nach MCA-Verschluß bei unbehandelten Tieren (n=5; str-utr) oder mit anti-TNF- und anti-CD95L-Antikörpern behandelten Tieren (n=10; str-utr). (B) Haltezeiten auf einem Stab mit einer allmählich ansteigenden Rotationsgeschwindigkeit für unbehandelte schein-

35 operierte (so-utr; n=6) und behandelte Schlaganfall-Tiere (str-tr; n=5). (C) Erste Erfahrungen der "so-utr"- und "str-tr"-Mäuse hinsichtlich Schwimmen.

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

5 (A) Ischämisches Tiermodell: In Wildtyp- (n=14), gld- (n=17),
tnf^{-/-} (n=13) und gld/tnf^{-/-} (n=15) Mäusen, die alle hinsicht-
lich des Alters (Mittelwert: 100 Tage) und des Gewichts (Mit-
telwert: 24 g) abgestimmt waren, wurde eine herdförmige cere-
brale Ischämie durch MCA-Verschluß wie von Zea Longa et al.,
10 Stroke 20 (1989), 84 beschrieben induziert. Ein chirurgischer
Nylonfaden wurde vom Lumen der gemeinsamen Halsschlagader bis
zur vorderen Cerebralarterie zur Blockierung des Ursprungs für
die MCA 90 Minuten geschlungen. Durch Entfernung des Nylonfa-
dens wurde der Blutfluß wieder hergestellt. Mittels Keta-
min/ROMPOM (je 150 mg/kg Körpergewicht) wurde eine tiefe Nar-
kose durchgeführt. Die Tiere wurden unter Narkose gehalten und
die rektale Temperatur wurde bei bzw. im Bereich von 37°C
mittels Hitze-erzeugenden Lampen sowohl während der chirurgi-
schen Eingriffe als auch des Zeitraums des MCA-Verschlusses
20 gehalten. Nach verschiedenen Reperusionsperioden wurden die
Tiere erneut tief narkotisiert und durch Abtrennen des Kopfes
getötet. Zum Erhalt physiologischer Parameter wurde in die
rechte Oberschenkelarterie unter andauernder Anästhesie eine
Kanüle eingeführt, der Blutdruck kontinuierlich aufgezeichnet
25 und Proben bezüglich des Blut-Gasgehalts und Glucose 15 min
vor, 1 Stunde nach Beginn und 30 min nach Beendigung des MCA-
Abschlusses entnommen. Das Geschlecht der Mäuse variierte je
nach Verfügbarkeit. Der Ausgang des Infarkts wurde durch das
Geschlecht der Tiere jedenfalls nicht beeinflusst. Alle Mäuse
30 hatten einen C57BL/6-Hintergrund, um so die bekannten Unter-
schiede bezüglich der Empfänglichkeit für einen Infarkt in
Abhängigkeit vom jeweiligen Mäusestamm zu vermeiden (Connolly
et al., Neurosurgery 38 (1996), 523). Für die Behandlungs-
experimente wurden jeweils 50 µg anti-CD95L-Antikörper MFL3
35 und anti-TNF-Antikörper V1q entweder i.v. oder i.p. 15 min und
24 Stunden nach MCA-Verschluß injiziert.

(B) Messung der Infarktausdehnung: Die Mäuse wurden einem MCA-

Filamentverschluß für 90 min unterzogen und es erfolgte wie beschrieben eine Reperfusion für 24 Stunden. Die Vorderhirne wurden geschnitten und kranzförmige Kryostat-Schnitte (Dicke: 20 μm , jeweils 400 μm voneinander entfernt) wurden Silbergefärbt. Kurz zusammengefaßt wurde so vorgegangen: Schnitte wurden mit einer Silbernitrat/Lithiumcarbonat-Lösung 2 min imprägniert und mit einer Hydrochinon/Formaldehyd-Lösung 3 min entwickelt. Gefärbte Schnitte wurden direkt gescannt (MCID-M4, 3.0. Das Infarktvolume wurde durch numerische Integration des gescannten Bereichs mit ausgeprägter Blässe bestimmt (korrigiert für Gehirnodem \times Schnitttdicke unter Verwendung digitaler Planimetrie (Swanson et al., J.Cereb.Blood Flow Metab. 10 (1990), 290)). Alle Daten sind als Mittelwerte \pm S.E.M (mittlere Standardabweichung) angegeben. Die Signifikanz wurde mittels des MANN-WITHNEY's t-Tests ermittelt. Zur Herstellung von Infarkthäufigkeitskarten wurden die entsprechenden Schnitte gescannt, Infarkte dargestellt und auf eine Maske projiziert. Die Durchschnittsermittlung erfolgte mit einem "Scion Image β 3.b".

20

(C) Immunhistochemische Analyse der CD95L- und TNF-Expression
Kranzförmige Kryostat-Schnitte (20 μm) von Wildtypmäusen, bei denen ein 90minütiger MCA-Verschluß und eine 24stündige Reperfusion durchgeführt worden waren, wurden für eine immunhistochemische Analyse vorbereitet. Die Schnitte wurden mit einem monoclonalen Antikörper gegen CD95L (P62) oder einem monoclonalen Antikörper gegen TNF (Hartung) inkubiert. Immunreaktionen mit CD95L und TNF wurden entweder mit einem sekundären polyclonalen FITC-markierten oder einem sekundären monoclonalen Cy3-markierten Antikörper sichtbar gemacht.

30

(D) Nachweis der Infiltration von an Entzündungsprozessen beteiligten Zellen: Kranzförmige Kryostat-Schnitte (20 μm) von Wildtyp-, gld-, tnf^{-/-} und gld/tnf^{-/-}-Mäusen, bei denen ein 90minütiger MCA-Verschluß und eine 24stündige Reperfusion durchgeführt worden waren, wurden für eine Immunautoradiographie vorbereitet. Die Schnitte wurden 24 Stunden mit dem monoclonalen Antikörper gegen GR1 (Ly-1) oder einem monoclonalen

35

Antikörper gegen CD3 (Chemicon) inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit einem ^{125}I -markierten sekundären Antikörper inkubiert. Das Radioautogramm wurde (zusammen mit einem [^{125}I]-Standard-Set) auf einem Kodak "MinR1"-Röntgenfilm erstellt (Exposition: 21 Tage). Granulozyten- oder Lymphozyten-Infiltration in der ischämischen Hemisphäre wurden durch Messung der optischen Dichte und des Bereichs der Infiltrate mit einem Bildanalyse-System bestimmt (MCID).

10 (E) Zellkultur und experimentelle in vitro-Behandlung: Primäre neuronale Kulturen wurden von fötalen Mäusen (vom 15. bis 17. Tag) präpariert. Kurz zusammengefaßt wurde folgendermaßen vorgegangen: Rindenneuronen wurden nach Zerreiben im MEM-Medium mit 20% Pferdeserum, 25 mM Glucose und 2 mM L-Glutamin erhalten. Danach folgte eine 30minütige Spaltung in 0,025% Trypsin/Kochsalzlösung. Die Zellen wurden in Platten mit 24 Vertiefungen, die mit Polyornithin beschichtet waren, ausplattiert. Nach vier Tagen wurden die Zellen für weitere vier Tage zur Hemmung der Proliferation nicht-neuronaler Zellen mit Cytosin-Arabinosid (5 μM) behandelt. Danach wurden die Zellkulturen in MEM, 10% Pferdeserum, 5% fötalem Rinderserum, 25 mM Glucose und 2 mM L-Glutamin bei 37°C in einem angefeuchteten CO_2 -Inkubator (8%) gehalten. Die Neuronen wurden mindestens 8 Tage vor der experimentellen Verwendung in Kultur reifen gelassen. Der Anteil von Gliazellen in den Kulturen lag unter 10% (abgeschätzt mittels eines Antikörpers gegen "glial-fibrillary-acidic protein" (GFAP)).

30 (F) Sauerstoff/Glucose-Entzug in vitro: Ein kombinierter Sauerstoff/Glucose-Entzug wurde durchgeführt. Das Kulturmedium wurde gegen MEM, 1% Pferdeserum und 2 mM L-Glutamin ausgetauscht. Die Kulturen wurden 6 Stunden bei 37°C und 100% Feuchtigkeit in einer anaeroben Kammer gehalten, die das Gasgemisch 5% H_2 /85% N_2 /5% CO_2 enthielt. Der kombinierte Sauerstoff/Glucose-Entzug wurde durch Entfernung der Kulturen aus der Kammer und Zugabe von Pferdeserum, fötalem Rinderserum und Glucose bis zu einer Endkonzentration von 10%, 5% bzw. 25 mM beendet. Die Kulturen wurden dann bei 37°C für weitere 3, 18 oder 24 Stunden

in einem befeuchteten Inkubator inkubiert, der 8% CO₂ und atmosphärischen Sauerstoff enthielt. Humanes IgG₁, CD95-Fc und TNF-R2-Fc (jeweils 20µM) wurden 5 min vor der Induktion von OGD zu dem Kulturmedium gegeben. Der Prozentsatz an Zelltod wurde mittels des "Trypanblau-Ausschluß"-Verfahrens bestimmt und als % spezifischer Zelltod angegeben. Dieser wurde folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ spezifischer Zelltod} = \frac{(\text{bestimmter} - \text{spontaner Zelltod}) \times 100}{(100 - \text{spontaner Zelltod})}$$

Der spontane Zelltod betrug 12% ± 0,9 für Neuronen der tnfr-α "knockout"-Mäuse, 10% ± 0,73 für Neuronen von gld-Mäusen und 15% ± 0,87 für Neuronen von C57BL/6 Wildtypmäusen. Alle Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3) angegeben.

(F) Motorische Koordination: 12 bis 16 Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse wurden auf einen fixierten horizontalen Holzstab oder Plexiglasstab gesetzt und die Zeit, in der das Tier auf dem Stab blieb, wurde gemessen. Für die Experimente mit dem sich drehenden Stab wurde die Maus auf eine mit feinem Splitt beschichtete Plastikrolle gesetzt, die innerhalb von 5 min. von 4 auf 40 UpM beschleunigt wurde. Die Haltezeiten wurden innerhalb eines Zeitraums bis zu 180 sec aufgezeichnet.

25

Tabelle 1

Physiologische Variable vor, während und nach MCA-Verschluß
in Wildtyp(C57BL/6)-, gld-, tnf^{-/-}- und gld/tnf^{-/-}-Mäusen.

		<u>Tier</u>	<u>vor</u>	<u>während</u>	<u>nach</u>
5	MABP (mmHg)	Wildtyp	95±8	93±10	95±12
		gld	92±12	95±8	95±8
		tnf ^{-/-}	77,5±6	72±9	105±5
		<u>gld/tnf^{-/-}</u>	<u>75±4</u>	<u>82±13</u>	<u>84±12</u>
10	Arterieller pH	Wildtyp	7,22±0,05	7,17±0,04	7,2±0,02
		gld	7,3±0,07	7,22±0,09	7,23±0,02
		tnf ^{-/-}	7,25±0,04	7,25±0,06	7,21±0,01
		<u>gld/tnf^{-/-}</u>	<u>7,16±0,07</u>	<u>7,14±0,11</u>	<u>7,13±0,08</u>
	Arterieller				
15	PaCO ₂	Wildtyp	53,9±5	58,4±4	44,5±3
	(Torr)	gld	48,7±5	51,4±11	49,9±1
		tnf ^{-/-}	54,4±1	47,2±1	53,6±1
		<u>gld/tnf^{-/-}</u>	<u>64,3±7</u>	<u>59,5±7</u>	<u>57,8±9</u>
	Arterieller				
20	PaO ₂	Wildtyp	152±26	82±6	124±11
	(Torr)	gld	158±21	96±18	86±6
		tnf ^{-/-}	118±14	126±14	98±6
		<u>gld/tnf^{-/-}</u>	<u>103±8</u>	<u>84±10</u>	<u>115±6</u>
	Hämatocrit	Wildtyp	35±5	45±1	39±4
25		gld	42±4	40±2	36±4
		tnf ^{-/-}	41±1	46±2	42±1
		<u>gld/tnf^{-/-}</u>	<u>40±6</u>	<u>39±8</u>	<u>35±8</u>
	Blutglucose	Wildtyp	206±17	225±17	217±27
	(mg/dl)	gld	153±23	170±21	133±21
30		tnf ^{-/-}	182±16	242±44	231±25
		<u>gld/tnf^{-/-}</u>	<u>216±50</u>	<u>171±43</u>	<u>187±55</u>

MABP: mittlerer arterieller Blutdruck; Blutgase (pH, PaCO₂ und PaO₂) und Blutglucose wurden 15 min vor, 1 Stunde nach Beginn und 30 min nach Beendigung des MCA-Verschlusses gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (alle Gruppen,

n=4) angegeben. Die Signifikanz wurde durch Vergleich der gld-, tnf^{-/-} und gld/tnf^{-/-}-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen mittels des Student t-Tests (P<0,05) gemessen.

5 **Beispiel 2: CD95L und TNF fördern synergistisch den Zelltod nach Hirn-Ischämie**

Zur Untersuchung der Rolle von TNF und CD95L und ihrer möglichen Interaktion bei den Schäden durch Ischämie im Gehirn wurden Mäuse, die eine gezielte Disruption des tnf-Gens tnf^{-/-} trugen, Mäuse mit einem mutierten CD95L mit der blockierten Fähigkeit zur erfolgreichen Interaktion mit CD95 (gld), Mäuse mit einem mutierten CD95L und defizient für TNF (gld/tnf^{-/-}) und Wildtypmäuse (WT), die alle einen C57BL/6 Hintergrund aufwiesen, verwendet. tnf^{-/-} und gld-Mäuse zeigten keine Entwicklungsanomalien und nur spezifische Defekte hinsichtlich Immunantworten. gld/tnf^{-/-}-Mäuse zeigten keine strukturellen oder morphologische Anomalien und die mittels "Nissl"-Färbung der koronalen Kryostat-Schnitte bestimmte Gehirnanatomie erschien normal. WT-, gld-, tnf^{-/-} und gld/tnf^{-/-}-Mäuse wurden einem 90minütigen MCA-Verschluß unterworfen und der vor, während und nach dem MCA-Verschluß gemessene Glucosegehalt schwankte nicht signifikant zwischen den einzelnen Tiergruppen (siehe Tabelle 1). Das von Wildtyptieren gezeigte mittlere Infarktvolumen war in guter Übereinstimmung mit dem bei anderen Gruppen in ähnlichen Experimenten erhaltenen. Daten von Mäusen, die keine ischämische Läsion zeigten, oder von Mäusen, die vor Beendigung des Beobachtungszeitraums starben (41% Wildtyp-, 29% gld- und 17% tnf^{-/-}-Mäuse; Figur 1a), wurden nicht in die Analysen des Infarktvolumens miteinbezogen.

30 In gld- und tnf^{-/-}-Mäusen war das Infarktvolumen im Vergleich zu Wildtypmäusen signifikant um etwa 54% bzw. 67% verringert ($23,23 \pm 4,97 \text{ mm}^3$, n=8 und $16,44 \pm 7,24 \text{ mm}^3$, n=7 gegenüber $50,11 \pm 8,38 \text{ mm}^3$, n=9; für beide P<0,01; Fig.1b). Überraschenderweise war der neuronale Schutz bei Fehlen von sowohl CD95L und

35 TNF sehr stark verbessert. gld/tnf^{-/-}-Mäuse zeigten ein mittleres Infarktvolumen, das im Vergleich zu Wildtypmäusen signifikant geringer war ($3,97 \pm 1,52 \text{ mm}^3$, n=8 bzw. $50,11 \pm 8,38 \text{ mm}^3$, n=9; P<0,0001; Fig.1b).

Die regionale Infarktverteilung in der coronalen Ebene wurde mittels der Durchschnittsermittlung der Infarktbereiche (coronaler Schnitt bei Bregma -2,3 mm) analysiert. Die erhaltene Häufigkeitsdichte-Karte zeigt eine relative Aussparung des motorischen und somatosensorischen Cortex und des Striatums in gld-Mäusen und eine relative Aussparung des gesamten angrenzenden Neocortex, des Striatums und des Thalamus in tnf^{-/-}-Mäusen (Fig. 1c). In gld/tnf^{-/-}-Mäusen waren das Striatum, der Cortex und der Thalamus durch den ischämischen Insult nicht betroffen und der Schaden blieb hauptsächlich auf den Hippocampus beschränkt (Fig. 1c).

CD95L und TNF werden in Neuronen der ischämischen Penumbra exprimiert. Um zu untersuchen, ob sie auf derselben Zelle lokalisiert sind, wurde die Expression von CD95L und TNF in Hirnschnitten von Tieren, bei denen ein 90minütiger MCA-Ver-schluß und eine 24stündige Reperfusion durchgeführt worden waren, mittels Doppel-Immunfluoreszenz analysiert. In der ischämischen Penumbra war TNF auf CD95L exprimierenden Zellen lokalisiert (Fig. 2). Somit könnten TNF und CD95L ihre Expression gegenseitig erhöhen.

Beispiel 3: CD95L und TNF fördern den neuronalen Tod und Entzündungen

Um den der Förderung der ischämischen Hirnschädigung durch CD95L und TNF zugrunde liegenden Mechanismus näher untersuchen zu können, wurde das in vitro-Modell des Sauerstoff/Glucose-Entzugs (OGD) verwendet. OGD in primären neuronalen Kulturen stellt ein übliches in vitro-Modell für die Untersuchung von frühen Mechanismen bei Schädigungen durch einen vaskulären Schlaganfall in einem System dar, das ausschließlich aus Neuronen besteht. Von Wildtyp-, gld-, tnf^{-/-}- und gld/tnf^{-/-}-Mäusen erhaltene primäre corticale Neuronen wurden einem 6stündigen OGD und für 3, 18 bzw. 24 Stunden einer Reperfusion unterworfen. tnf^{-/-}-Neuronen waren im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen gegenüber einer OGD/Reperfusion induzierten Schädigung im wesentlichen resistent; nur etwa 10% der tnf^{-/-}-Neuronen starben nach OGD/Reperfusion, während bis zu 47% der WT-Neuronen starben (Fig. 3a). Zu jedem untersuchten Zeitpunkt war das

Ausmaß des spezifischen Zelltods der gld-Neuronen etwa 20% geringer im Vergleich zu WT-Neuronen (Fig. 3a). Von gld/tnf^{-/-}-Mäusen stammende neuronale Zellen konnten in Kultur nicht gezüchtet werden, was vermutlich durch die spezifische in vitro-Situation bedingt war.

tnf^{-/-} und gld-Mäuse zeigten eine normale Entwicklung und Anatomie des Gehirns. Dieser offensichtlich normale "Cerebral-Phänotyp" könnte auf dem Vorhandensein eines kompensatorischen Mechanismus beruhen, der einen unspezifischen Schutz gegen Gehirn-Ischämie liefert. Um diese Möglichkeit ausschließen zu können, wurden 15 min vor der Induktion des OGD WT-Neuronen mit CD95-Fc- und TNF-R2-Fc-Proteinen behandelt. Nach 6 Stunden OGD und 18 Stunden Reperfusion verringerte der Entzug entweder von CD95L oder TNF- α die Neurotoxizität der Kulturen um 25% bzw. 39% im Vergleich zu mit IgG₁ (Immunglobulin G₁) behandelten Kontrollen (Fig. 3b). Somit kann die Hemmung der Aktivität von TNF und CD95L den OGD/Reperfusion-induzierten neuronalen Tod spezifisch blockieren.

In der in vivo-Situation setzen kurz nach Verringerung des cerebralen Blutflusses Zytokinproduktion und molekulare adhäsive Ereignisse ein. Der von dem ischämischen Parenchym produzierte TNF ist an der endothelialen Zellexpression von zellulären adhäsiven Molekülen beteiligt, beispielsweise des interzellulären "adhesion molecule-1" (ICAM-1), des vasculären "cell adhesion molecule-1" (VCAM-1) und des "endothelial-leukocyte adhesion molecule-1" (E-selectin). Adhäsionsmoleküle erleichtern die Rekrutierung von an Entzündungsprozessen beteiligten Zellen zu der ischämischen Läsion. Für CD95L wurden in Tumoren ähnliche chemotaktische Eigenschaften beschrieben. Nach diesen Befunden stellte sich die Frage, ob zusätzlich zu der den Zelltod fördernden Rolle von CD95L und TNF im Anschluß an eine Ischämie diese beiden Moleküle auch durch Rekrutierung von an Entzündungsprozessen beteiligten Zellen an der ischämischen Schädigung beteiligt sind. Zur Beantwortung dieser Frage wurden in Gehirnschnitten von Wildtyp-, gld-, tnf^{-/-} und gld/tnf^{-/-}-Mäusen (n jeweils = 3), die einer fokalen Ischämie (90 min MCA-Verschluß und 24 Stunden Reperfusion) unterworfen

worden waren, die Gegenwart von infiltrierenden Granulozyten und infiltrierenden Lymphozyten mittels Autoimmunradiographie analysiert. Kontrollfärbungen ohne den ersten Antikörper oder von Gehirnschnitten von scheinoperierten Tieren waren negativ.

5 Die quantitative Analyse von Autoradiogrammen ergab ein abnehmendes Ausmaß der Granulozyten-Infiltration in gld^- , $tnf^{-/-}$ und $gld/tnf^{-/-}$ -Mäusen (vom höchsten bis zum niedrigsten Infiltrationsgrad angeordnet), die im Einklang mit dem Ausmaß der Gehirnschädigung stand (Fig. 4). Das Ausmaß der Lymphozyten-

10 Infiltration war in WT- und $gld/tnf^{-/-}$ -Mäusen vergleichbar und etwas erhöht im Vergleich zu gld^- und $tnf^{-/-}$ -Mäusen (Fig. 4). Diese Daten deuten auf eine synergistische chemotaktische Wirkung von TNF und CD95L in Richtung Granulozyten im Anschluß an Ischämie.

15

Beispiel 4: Die Behandlung mit anti-TNF- und anti-CD95L-Antikörpern verringert die ischämischen Schädigungen

Um die Erkenntnisse aus den genetisch veränderten Tieren in die Praxis umzusetzen, wurden im Anschluß an eine fokale Ischämie in vivo TNF und CD95L neutralisiert. In WT-Mäusen induzierte eine Injektion von anti-TNF- und anti-CD95L-Antikörpern i.v. (jeweils 50 μ g) 15 min nach MCA-Verschluß eine etwa 60%ige Verringerung des Infarktolumens im Vergleich zu unbehandelten Tieren ($18,04 \pm 4,87 \text{ mm}^3$, $n=8$, in behandelten

20 Mäusen versus $50,11 \pm 8,38 \text{ mm}^3$, $n=9$, $P < 0,01$; Fig. 5a) Die regionale Infarktverteilung in der coronalen Ebene wurde durch die Ermittlung des Durchschnitts der Infarktzone (coronaler Schnitt bei Bregma -2,3 mm) bestimmt. Die erhaltene Häufigkeitsdichte-Karte zeigt eine fast ausschließliche Beteiligung

25 des Hippocampus und des piriformen Cortex in der ischämischen Läsion von behandelten Tieren ("stroke-tr"; Fig. 5b). In behandelten Tieren waren auch entzündliche Infiltrate kaum nachweisbar (Fig. 5c).

Die Funktionalität der geretteten Neuronen wurde durch Tests hinsichtlich der motorischen Koordination von behandelten Mäusen nach drei Tagen Reperfusion untersucht. Dazu wurden 15 min und 24 Stunden nach MCA-Verschluß anti-TNF- und anti-CD95L-Antikörper (jeweils 50 μ g) i.p. injiziert. Alle unbe-

35

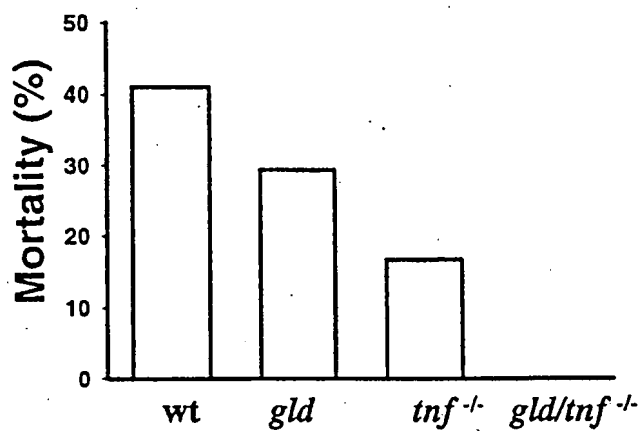
handelten, einer fokalen Ischämie unterworfenen Tiere starben vor Beendigung dieses Zeitraums ("stroke-utr"; n=5), während die Mortalität in der behandelten Gruppe ("stroke-tr"; n=10) nur 30% betrug (Fig. 6a). Sechs scheinoperierte unbehandelte Tiere ("so-utr") und fünf behandelte Mäuse, bei denen ein 90minütiger MCA-Verschluß und eine dreitägige Reperfusion durchgeführt worden waren, wurden auf einem rotierenden Stab und stationären Stäben getestet. Das von den ischämischen behandelten Tieren gezeigte Haltevermögen auf dem rotierenden Stab unterschied sich nicht signifikant von dem der scheinoperierten Tiere (Fig. 6b/c). Die motorische Koordination auf stationären Stäben verlief zu diesen Ergebnissen parallel. Die Aufrechterhaltung der die Achse betreffenden Balance war in "so-utr"- und "stroke-utr"-Tieren vergleichbar. Sogar Tiere mit einer geringen Haltezeit auf dem rotierenden Stab zeigten dann, wenn sie zum ersten Mal in Wasser gebracht wurden, eine unbeeinträchtigte die Achse betreffende Balance.

Patentansprüche

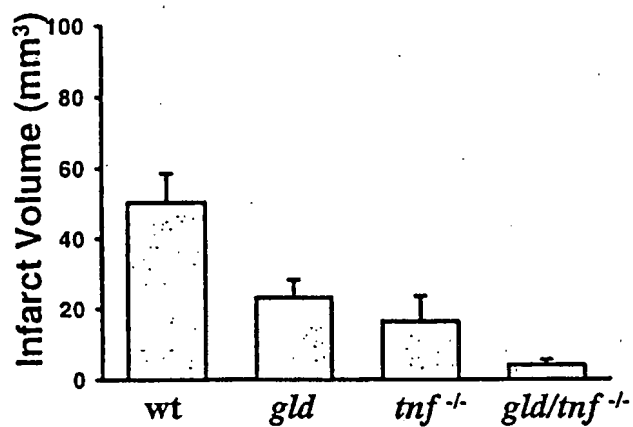
- 5 1. Arzneimittel, eine oder mehrere Verbindungen enthaltend,
welche die biologische Wirkung von TNF- α und CD95L hemmen.
- 10 2. Arzneimittel nach Anspruch 1, wobei die Verbindungen ein
neutralisierender anti-TNF- α -Antikörper und ein neutralisierender anti-CD95L-Antikörper oder Fragmente davon sind.
- 15 3. Arzneimittel nach Anspruch 2, wobei der Antikörper ein
monoclonaler Antikörper oder ein Fragment davon ist.
- 20 4. Arzneimittel nach Anspruch 3, wobei der monoclonale Antikörper ein aus einem Tier stammender Antikörper, ein humanisierter Antikörper oder ein chimärer Antikörper oder ein Fragment davon ist.
- 25 5. Arzneimittel nach Anspruch 1, wobei die Verbindungen (a) ein TNF- α -Antagonist und ein CD95L-Antagonist, (b) ein löslicher TNF- α -Rezeptor und ein löslicher CD95-Rezeptor oder Teile davon oder (c) Gemische aus einer oder beiden Verbindungen aus (a) und (b) sind.
6. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, ferner ein thrombolytisches Mittel enthaltend.
- 30 7. Verwendung der in den Ansprüchen 1 bis 6 definierten Verbindung(en) zur Prävention oder Behandlung eines Schlaganfalls, Herzinfarkts oder einer degenerativen Erkrankung, insbesondere Alzheimer, Parkinson und Rückenmark-Trauma.

FIGUR 1

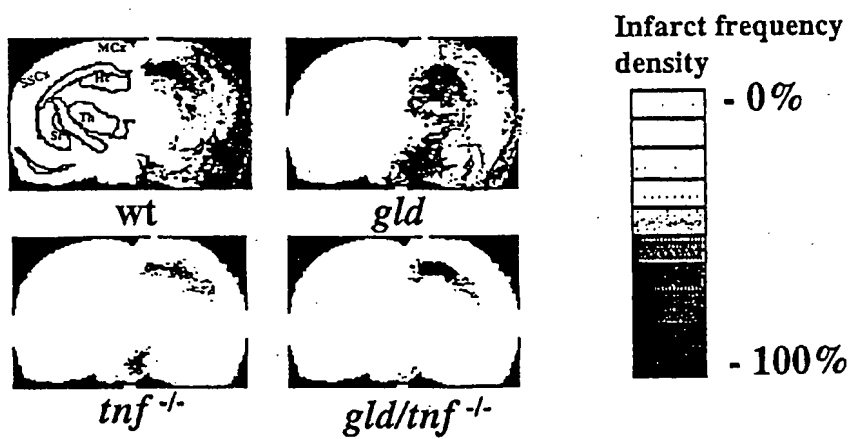
A



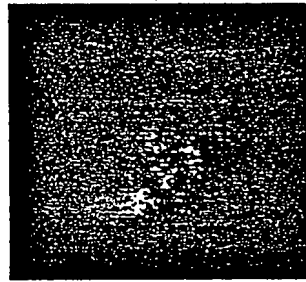
B



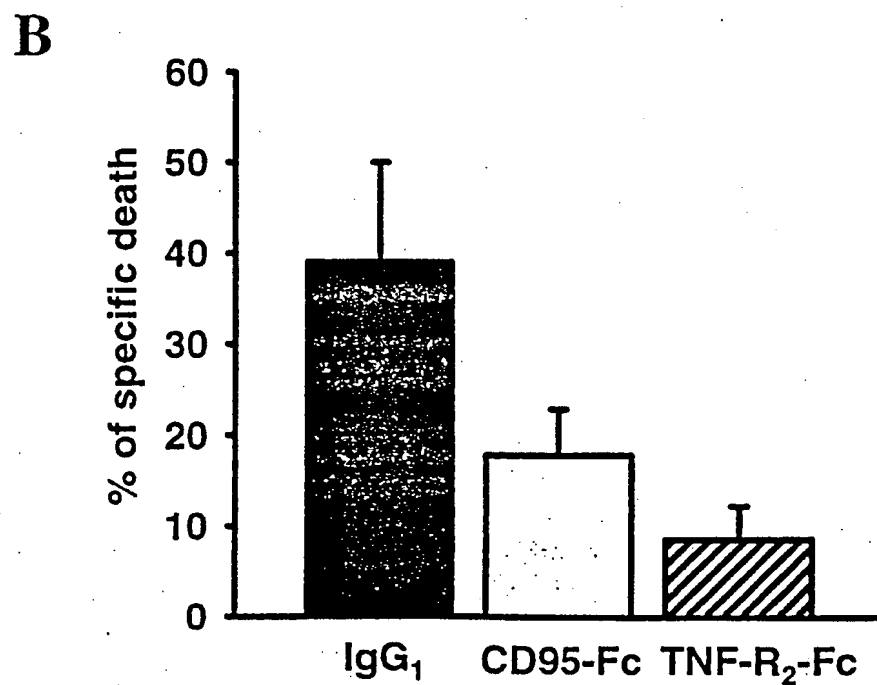
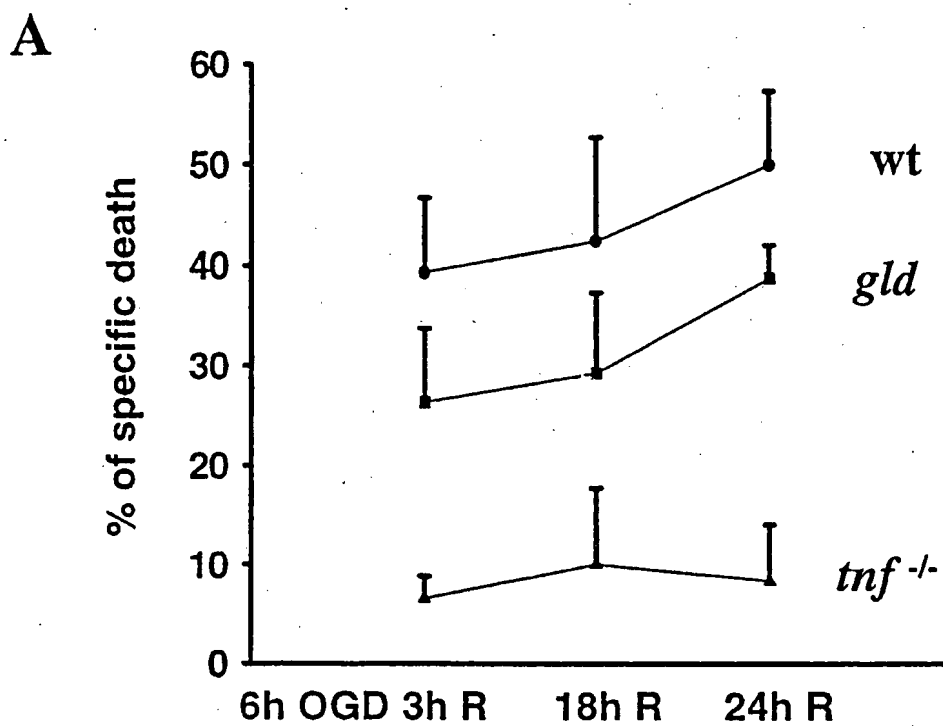
C



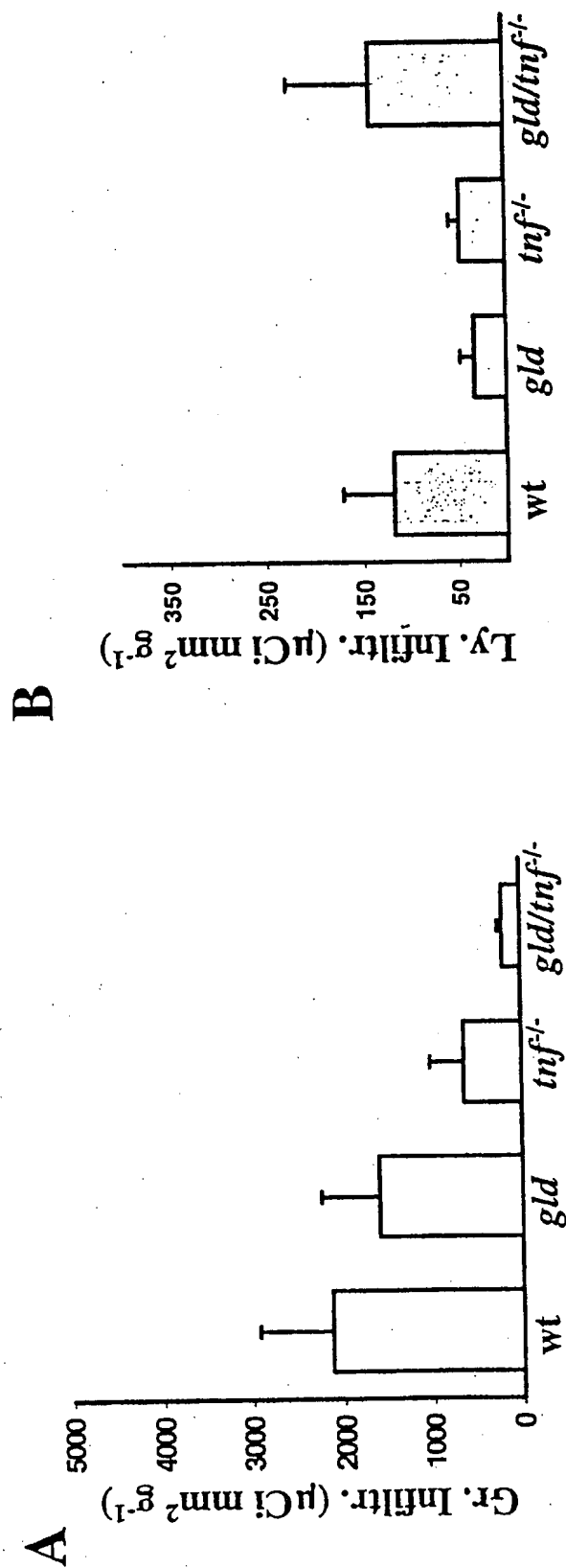
FIGUR 2



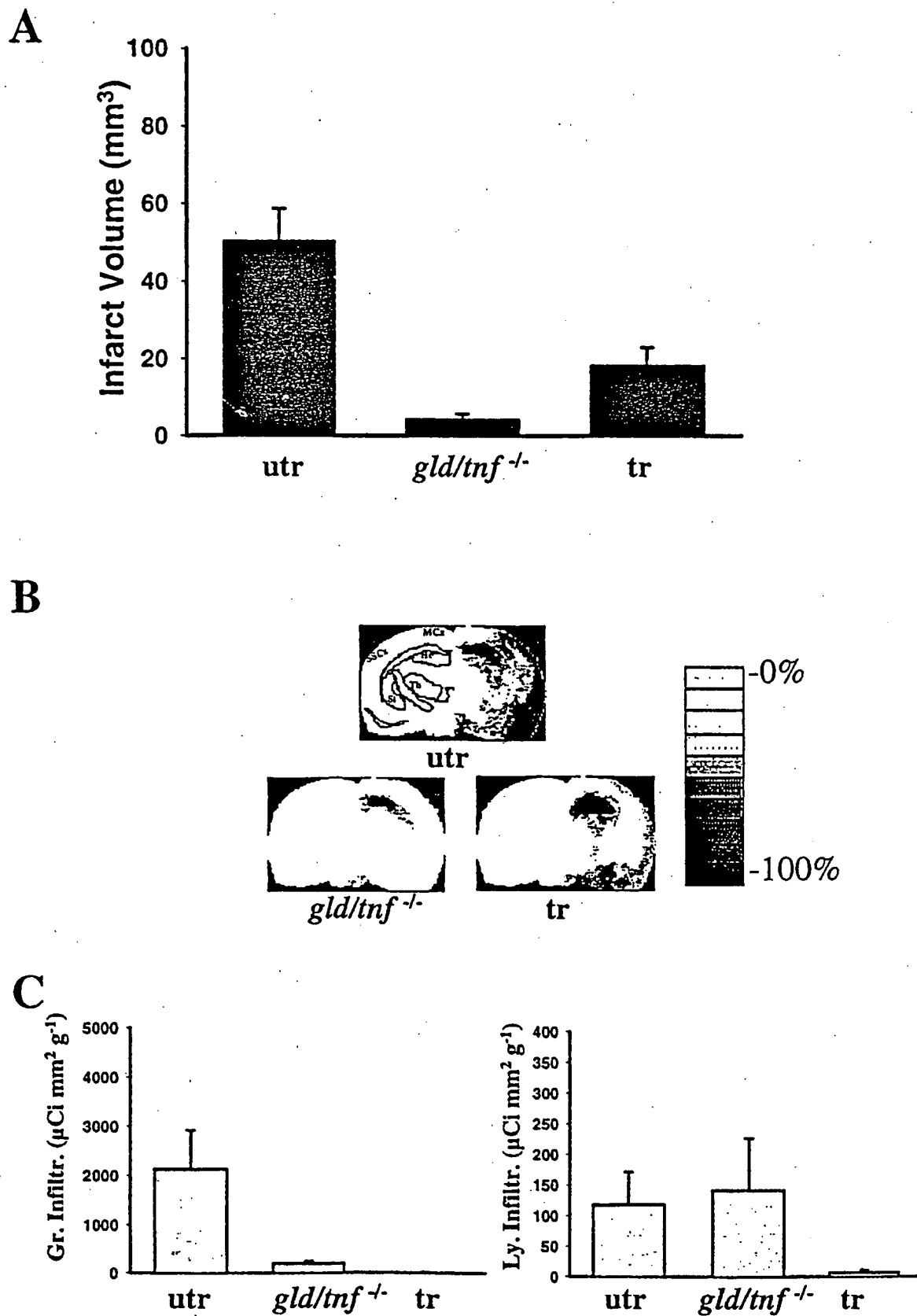
FIGUR 3



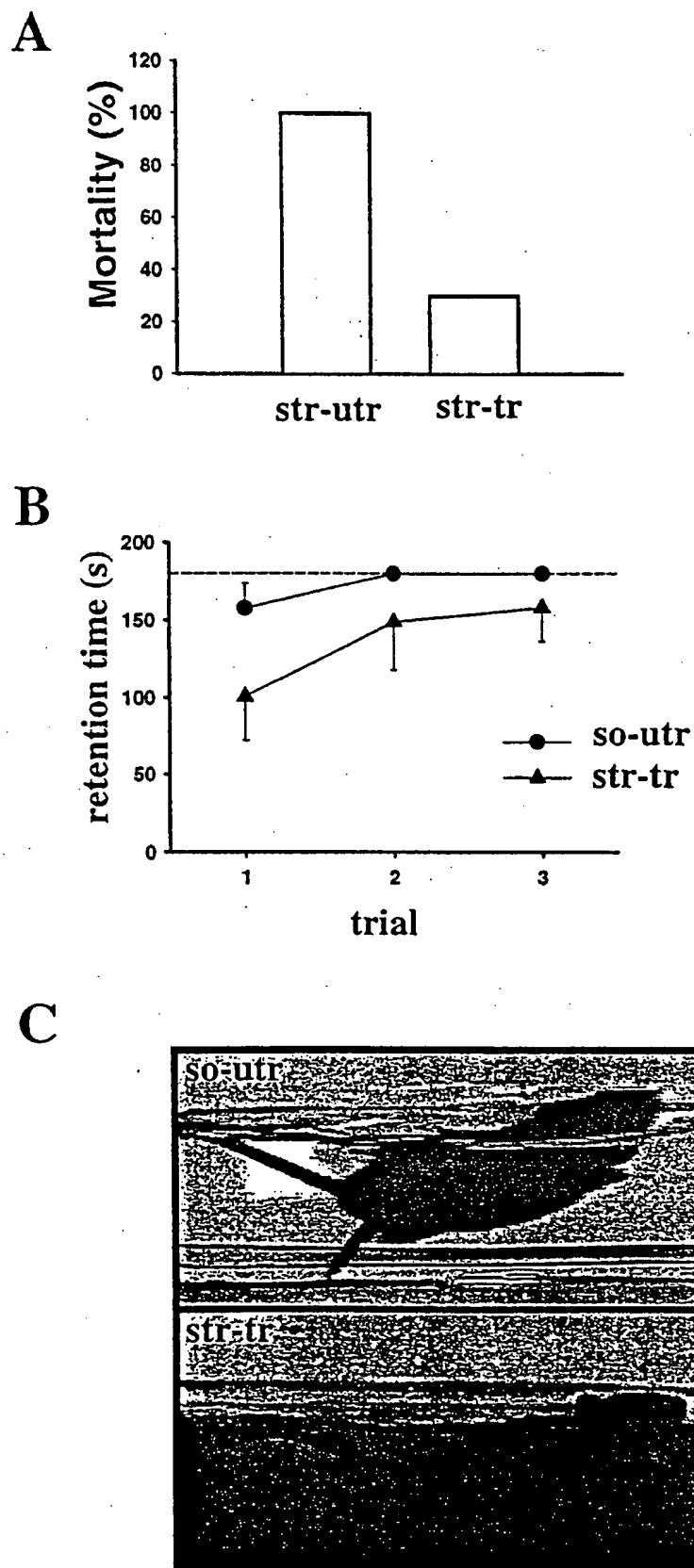
FIGUR 4



FIGUR 5



FIGUR 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/04371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/395 A61P9/10 A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKAZAWA T ET AL: "Cytolytic mechanisms involved in non-MHC-restricted cytotoxicity in Chediak-Higashi syndrome." CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, (1999 OCT) 118 (1) 108-14. , XP000984560 page 109 abstract	1,2,5
X	HATTORI K ET AL: "A metalloproteinase inhibitor prevents lethal acute graft-versus-host disease in mice." BLOOD, (1997 JUL 15) 90 (2) 542-8. , XP000984491 abstract	1,5



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 March 2001

Date of mailing of the international search report

24.04.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

von Ballmoos, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No

PCT/DE 00/04371

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARTIN-VILLALBA A ET AL: "CD95 LIGAND (FAS-L/APO-1L) AND TUMOR NECROSIS FACTOR-RELATED APOPTOSIS-INDUCING LIGAND MEDIATE ISCHEMIA-INDUCED APOPTOSIS IN NEURONS" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 19, no. 10, 15 May 1999 (1999-05-15), pages 3809-3817, XP000980204 ISSN: 0270-6474 abstract page 3809, last paragraph -page 3810, paragraph 1	7
A	MARTIN-VILLALBA, A. (1) ET AL: "Protection against brain ischemia induced apoptosis mediated by the CD95 ligand system in lpr mice." SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, (1998) VOL. 24, NO. 1-2, PP. 275. MEETING INFO.: 28TH ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, PART 1 LOS ANGELES, CALIFORNIA, USA NOVEMBER 7-12, 1998 SOCIETY FOR NEUROSCIENCE. , XP000984977 the whole document	1-7
A	CROW, MICHAEL T. ET AL: "The role of the tumor suppressor gene p53 in cardiomyocyte apoptosis" HEART FAILURE REV. (1998), 3(1), 45-61 , XP000984631 abstract	1-7
P,X	JEREMIAS I ET AL: "Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia." CIRCULATION, (2000 AUG 22) 102 (8) 915-20. , XP000984492 the whole document	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE00/04371

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 7 relates to a method for the treatment of the human/animal body, a search was carried out and was based on the indicated effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/04371

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K39/395 A61P9/10 A61P25/28

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NAKAZAWA T ET AL: "Cytolytic mechanisms involved in non-MHC-restricted cytotoxicity in Chediak-Higashi syndrome." CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, (1999 OCT) 118 (1) 108-14. , XP000984560 Seite 109 Zusammenfassung	1,2,5
X	HATTORI K ET AL: "A metalloproteinase inhibitor prevents lethal acute graft-versus-host disease in mice." BLOOD, (1997 JUL 15) 90 (2) 542-8. , XP000984491 Zusammenfassung	1,5



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. März 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24.04.01

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

von Ballmoos, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte.ionales Aktenzeichen

PCT/DE 00/04371

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MARTIN-VILLALBA A ET AL: "CD95 LIGAND (FAS-L/APO-1L) AND TUMOR NECROSIS FACTOR-RELATED APOPTOSIS-INDUCING LIGAND MEDIATE ISCHEMIA-INDUCED APOPTOSIS IN NEURONS"</p> <p>JOURNAL OF NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, Bd. 19, Nr. 10, 15. Mai 1999 (1999-05-15), Seiten 3809-3817, XP000980204</p> <p>ISSN: 0270-6474</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>Seite 3809, letzter Absatz -Seite 3810, Absatz 1</p>	7
A	<p>MARTIN-VILLALBA, A. (1) ET AL:</p> <p>"Protection against brain ischemia induced apoptosis mediated by the CD95 ligand system in lpr mice."</p> <p>SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, (1998) VOL. 24, NO. 1-2, PP. 275. MEETING INFO.: 28TH ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, PART 1 LOS ANGELES, CALIFORNIA, USA NOVEMBER 7-12, 1998</p> <p>SOCIETY FOR NEUROSCIENCE. ,</p> <p>XP000984977</p> <p>das ganze Dokument</p>	1-7
A	<p>CROW, MICHAEL T. ET AL: "The role of the tumor suppressor gene p53 in cardiomyocyte apoptosis"</p> <p>HEART FAILURE REV. (1998), 3(1), 45-61 ,</p> <p>XP000984631</p> <p>Zusammenfassung</p>	1-7
P,X	<p>JEREMIAS I ET AL: "Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia."</p> <p>CIRCULATION, (2000 AUG 22) 102 (8) 915-20.</p> <p>XP000984492</p> <p>das ganze Dokument</p>	1-7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 00/04371

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Obwohl der Anspruch 7 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.